大头兔儿风内生真菌温特曲霉 *Aspergillus wentti* Y1 的化学成分及其生物活性研究

杨骆杰[1]，丁　婷[3]，周　元[4]，覃江江[4,5]，沈云亨[2]，张卫东[1,2*]

1. 上海中医药大学交叉科学研究院，上海　201203
2. 海军军医大学药学院，上海　200433
3. 中国医药工业研究总院，上海　201203
4. 浙江中医药大学药学院，浙江 杭州　310053
5. 中国科学院肿瘤与基础医学研究所，中国科学院大学肿瘤医院，浙江省肿瘤医院，浙江 杭州　310022

摘　要：目的　研究大头兔儿风 *Ainsliaea macrocephala* 内生真菌温特曲霉 *Aspergillus wentti* Y1 次生代谢产物的化学结构及其生物活性。**方法**　运用硅胶、Sephadex LH-20 凝胶、薄层色谱（TLC）和半制备高效液相色谱等方法对菌株发酵液的醋酸乙酯萃取物及菌丝甲醇提取物进行分离纯化，根据理化性质和波谱数据分析鉴定化学结构；采用 CCK-8 法测定化合物的细胞毒活性。**结果**　从发酵液的醋酸乙酯萃取物及菌丝甲醇提取物中分离到 10 个化合物，分别鉴定为 2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物（**1**）、yicathin A（**2**）、isosulochrin dehydrate（**3**）、1,6-二羟基-3-甲基-8-甲氧羰基呫吨酮（**4**）、yicathin C（**5**）、wentiquinone B（**6**）、大黄素甲醚（**7**）、曲霉内酯 B（**8**）、8-羟基-1,3-二甲氧基-6-甲基蒽醌（**9**）、藤黄绿脓菌素（**10**）。化合物 **10** 对人食管癌细胞株 OE19 的增殖显示出较强的抑制作用，其半数抑制浓度（IC_{50}）值为 5.8 μmol/L。**结论**　化合物 **1** 为新的呫吨酮类化合物，命名为 2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物；化合物 **10** 为首次从曲霉属真菌中分离得到。化合物 **10** 对人食管癌细胞株 OE19 具有明显的细胞毒性。

关键词：大头兔儿风；温特曲霉；内生真菌；细胞毒性；2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物；藤黄绿脓菌素

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2020)08- 2102 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.016

Study on chemical constituents of endophytic fungus *Aspergillus wentti* Y1 from *Ainsliaea macrocephala* and their bioactivities

YANG Luo-jie[1], DING Ting[3], ZHOU Yuan[4], QIN Jiang-jiang[4,5], SHEN Yun-heng[2], ZHANG Wei-dong[1,2]

1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China
4. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
5. Institute of Cancer and Basic Medicine, Chinese Academy of Sciences; Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences; Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, 310022, China

Abstract: Objective　To study the secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus wentti* Y1 isolated from *Ainsliaea macrocephala*. **Methods**　The compounds were isolated and purified from the ethyl acetate extract of the fungal fermentation broth and the methanol extract of the mycelial by silica gel, reverse phase silica gel ODS, Sephadex-LH20 column chromatography, TLC, HPLC, and so on. Their structures were identified by extensive spectroscopic analysis. The compounds were evaluated for cytotoxic activity against human esophagus cancer cell lines OE19 and SK-GT-4 by CCK8 assay. **Results**　Ten compounds were isolated from the fermentation broth and mycelial extracts of the strain *Aspergillus wentti* Y1, and identified as 2-hydroxyisosulochrin dehydrate (**1**), yicathin A (**2**), isosulochrin dehydrate (**3**), 1,6-dihydroxy- 3-methyl-8-carbomethoxyxanthone (**4**), yicathin C (**5**), wentiquinone B (**6**),

收稿日期：2020-01-21

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31870327）；国家自然科学基金资助项目（81520108030）；国家自然科学基金资助项目（81573318）

作者简介：杨骆杰，硕士生，专业方向为中药学。E-mail: yangluojie.1120@qq.com

***通信作者**　张卫东，教授，博士生导师，主要从事中药化学及药效物质基础研究。E-mail: wdzhangy@hotmail.com

physcion (**7**), aspergillactone B (**8**), 8-hydroxy-1,3-dimethoxy-6-methylanthraquinone (**9**) and pyoluteorin (**10**), respectively. Compound **10** exhibited potent cytotoxicity against human esophagus cancer cell lines OE19 with the IC_{50} value of 5.8 μmol/L. **Conclusion** Compound **1** was identified as new compound, and named 2-hydroxyisosulochrin dehydrate. Compound **10** is isolated from *Aspergillus* species for the first time. Compound **10** exhibited potent cytotoxicity against human esophagus cancer cell lines OE19.

Key words: *Ainsliaea macrocephala* (Mattf.) Y. C. Tseng; *Aspergillus wentti* Y1; endophytic fungus; cytotoxicity; 2-hydroxyisosulochrin dehydrate; pyoluteorin

植物内生真菌是指一定周期或部分周期生活于健康植物各个器官或组织中的真菌[1]。它具有丰富新颖且生物活性较好的次生代谢产物，成为近年来发现新天然产物的重要来源[2]。大头兔儿风 *Ainsliaea macrocephala* (Mattf.) Y. C. Tseng 为兔儿风属 *Ainsliaea* DC. 植物，主要生长于云南、四川等地，为西南地区常用民族药，具有抗炎、镇静作用，可以用于治疗胃痛、跌打损伤、水肿、风湿性关节炎等疾病[3]。据文献报道，大头兔儿风的化学成分主要有萜类、甾体及黄酮类等化合物[4]。然而关于大头兔儿风内生真菌及其次生代谢产物还未有人进行过研究。本课题组从大头兔儿风中分离得到 1 株内生真菌温特曲霉 *Aspergillus wentti* Y1。据报道，温特曲霉的次生代谢产物中多含有蒽醌类成分及其衍生物，是重要的真菌毒素产生菌[5]。为了从该菌株中发掘新的次生代谢产物，本实验对该菌株进行了液体发酵培养，并对其发酵液醋酸乙酯萃取物及菌丝甲醇提取物进行分离纯化，从中分离得到 10 个化合物，分别鉴定为 2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物（2-hydroxyisosulochrin dehydrate，**1**）、yicathin A（**2**）、isosulochrin dehydrate（**3**）、1,6-二羟基-3-甲基-8-甲氧羰基呫吨酮（1,6-dihydroxy-3-methyl-8-carbomethoxyxanthone，**4**）、yicathin C（**5**）、wentiquinone B（**6**）、大黄素甲醚（physcion，**7**）、曲霉内酯 B（aspergillactone B，**8**）、8-羟基-1,3-二甲氧基-6-甲基蒽醌（8-hydroxy-1,3-dimethoxy-6-methylanthraquinone，**9**）、藤黄绿脓菌素（pyoluteorin，**10**）。化合物 **1** 为新的呫吨酮类化合物，命名为 2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物；化合物 **10** 是首次从曲霉属真菌中分离得到。活性测试结果表明，化合物 **10** 对人食管癌细胞株 OE19 具有显著的细胞毒作用。

1 仪器与材料

Bruker Avance 500 MHz、Bruker Avance 600 MHz 核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；LC/MSD Trap XCT 质谱仪、Accurate-Mass-Q-TOF LC/MS 6520 高分辨质谱仪（美国 Agilent 公司）；Sephadex LH-20（美国 Pharmacia 公司）；薄层色谱硅胶 H（青岛海洋化工厂）；BUCHI C605 中压制备液相色谱仪（BUCHI 公司，瑞士）；安捷伦 1200 Series 高效液相色谱仪（Agilent 公司）；SPX-150B-Z 生化培养箱；SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台；YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌器；SK5200 超声波清洗仪；柱色谱硅胶（100～200、200～300 目，烟台江友硅胶开发公司）；硅胶板（烟台江友硅胶开发公司）；反相硅胶 YMC-Gel ODS A（40 μm，YMC，MA）；分析级甲醇、乙醇、二氯甲烷、醋酸乙酯、石油醚等常用溶剂（上海捷润化学试剂有限公司）；色谱级甲醇和乙腈（Fisher 公司）。人食管癌细胞株 OE19 和 SK-GT-4（上海拜力生物技术有限公司）。

大头兔儿风内生真菌菌株 *Aspergillus wentti* Y1 从云南省丽江市采集的大头兔儿风中分离得到，原植物由海军军医大学药学院沈云亨副教授鉴定为大头兔儿风 *Ainsliaea macrocephala* (Mattf.) Y. C. Tseng。将分离得到的菌株经总 DNA 制备，采用引物 NS1（3’-GTAGTCATATGCTTGTCTC-5’）和 NS8（3’-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-5’）扩增该菌株的 rDNA，测序获得的序列（GenBank 登陆号为 SUB6688078）通过 BLAST 2.8.1＋程序在 Genbank 上进行相似性序列检索分析，结果与 *Aspergillus wentii*（GenBank 登陆号为 AB008412.1）的相似度为 100%，因此鉴定菌株为温特曲霉 *Aspergillus wentii* Y1。菌种保存于海军军医大学药学院。

2 菌株的发酵

菌株的发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基：马铃薯浸出粉 6 g/L，葡萄糖 20 g/L，pH 值 7.0。在无菌条件下用接种针挑取适量菌体接种到装有 250 mL 培养液的锥形瓶中，在 28 ℃、120 r/min 的条件下摇床培养 6 d，获得种子液，然后取适量种子液转接到装有 1 L 培养液的 2 L 锥形瓶中，在 28 ℃下静置培养，培养 30 d，共发酵 30 L。

3 提取与分离

30 L 发酵产物经纱布滤过得发酵液和菌丝体，发酵液经醋酸乙酯萃取 6 次，50 ℃下减压浓缩得浸膏 8 g，菌丝体经甲醇萃取 8 次，50 ℃下减压浓缩

得浸膏 22 g。通过薄层色谱分析，可看到菌液醋酸乙酯萃取物与菌丝体甲醇萃取物次生代谢产物基本相同，故合并萃取物，减压蒸干得浸膏 30 g。浸膏（30 g）经中压反相硅胶柱色谱（YMC-Gel ODS A），甲醇-水（10∶90→100∶0）梯度洗脱，12 h，用薄层色谱（TLC）检测（显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂），合并相似组分，得到 15 个组分（Fr. 1～15）。Fr. 4 组份经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以二氯甲烷-甲醇（1∶1）洗脱得到 Fr. 4-1～4-5，Fr. 4-5 通过半制备 HPLC 分离，流动相为甲醇-水（70∶30），体积流量 2 mL/min，保留时间为 15.6 min 时，得到化合物 **1**（3 mg）。Fr. 5 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）洗脱得到 Fr. 5-1～5-6。Fr. 5-6 经凝胶 Sephadex LH-20 以甲醇-水（70∶30）等度洗脱，纯化得到化合物 **5**（30 mg）。Fr. 6 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）等度洗脱得到 Fr. 6-1～6-7，Fr. 6-6 组分以甲醇作为溶剂结晶得化合物 **8**（30 mg）。Fr. 6-7 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）洗脱，纯化得到化合物 **4**（10 mg）。Fr. 7 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）洗脱得到化合物 **10**（3 mg）。Fr. 9 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）洗脱得到 Fr. 9-1～9-10，纯化得到化合物 **2**（5 mg）、**3**（7 mg）、**6**（4 mg）和 **9**（4 mg）。Fr. 13 组分经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，以甲醇-水（70∶30）洗脱得到 Fr. 13-1～13-4，Fr. 13-1 以甲醇结晶得化合物 **7**（10 mg）。

4　结构鉴定

化合物 **1**：黄色粉末，易溶于氯仿。UV$\lambda_{max}^{CDCl_3}$(nm): 210, 240, 270, 290, 316；IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 454, 2 955, 2 924, 2 851, 1 741, 1 657, 1 609, 1 574, 1 496, 1 465, 1 207, 1 077, 1 025, 867, 661；紫外及红外光谱数据表明分子中含有羰基、酯基、苯环、羟基及甲基等基团。HR-ESI-MS *m/z*: 353.063 1 [M＋Na]$^+$（计算值 353.063 2，$C_{17}H_{14}O_7Na^+$），确定分子式为 $C_{17}H_{14}O_7$，不饱和度为 11，提示化合物中至少存在 2 个苯环结构。

化合物 **1** 的 ^{1}H-NMR 谱（表 1）显示有 3 个芳环质子 δ_H 6.88 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.86 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.73 (1H, s)，1 个甲基 δ_H 2.39 (3H, s)，2 个甲氧基 δ_H 4.02 (3H, s), 3.93 (3H, s)，2 个羟基质子 δ_H 12.22 (1H, s), 5.48 (1H, s)。^{13}C-NMR 谱显示有 17 个碳信号，结合 DEPT 谱及 HSQC 谱，推断存在 1 个酮羰基 (δ_C 179.9)、1 个酯羰基 (δ_C 169.4)、2 个甲氧基 (δ_C 56.1, 53.1)、1 个甲基 (δ_C 16.8)，剩余的 12 个芳香碳（包括 3 个次甲基芳香碳 δ_C 101.4, 107.4, 112.1）组成 2 个苯环。上述波谱特征，结合化合物存在 11 个不饱和度，推断化合物 **1** 结构中含有 1 个呫吨酮（xanthone）母核结构。化合物 **1** 的 ^{1}H 谱和 ^{13}C 谱化学位移数据和已知化合物 isosulochrin dehydrate 非常相似[6]，只是 C-2 位被取代，其化学位移大幅向低场位移到 δ_C 137.9，并且 C-1 位和 C-3 位化学位移明显向高场位移，提示化合物 **1** 可能是 isosulochrin dehydrate 的 2 位羟基取代产物。在 HMBC 谱中（图 1），羟基质子 δ_H 12.22 显示了和 C-9a (δ_C 106.8) 及 C-2 (δ_C 137.9) 的远程相关；另一个羟基质子 δ_H 5.48 和 C-1 (δ_H 145.6) 及 C-3 (δ_C 133.9) 也显示 HMBC 相关，说明 2 个羟基分别取代在 C-1 和 C-2 位；此外，2 个甲氧基分别显示了和酯羰基 δ_C 169.4 及氧取代芳香碳 δ_C 164.6 有远程相关，说明 2 个甲氧基分别和酯羰基和 C-6 位相连。δ_H6.86 的芳香质子观察到和酯羰基 δ_C 169.4 的远程相关，可将该质子归属为 7 位质子；δ_H 6.73 的质子

表 1　化合物 1 的 ^{1}H- 和 ^{13}C-NMR 数据 (500/125 MHz, $CDCl_3$)

Table 1　^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data of compound 1 (500/125 MHz, $CDCl_3$)

碳位	δ_H	δ_C
1		145.6
2		137.9
3		133.9
4	6.73 (1H, s)	107.4
4a		148.4
5	6.88 (1H, d, J = 2.4 Hz)	112.1
5a		158.5
6		164.6
7	6.86 (1H, d, J = 2.4 Hz)	101.4
8		134.9
8a		110.8
9		179.9
9a		106.8
10		169.4
3-CH_3	2.39 (3H, s)	16.8
6-OCH_3	3.93 (3H, s)	56.1
10-OCH_3	4.02 (3H, s)	53.1
1-OH	12.22 (1H, s)	
2-OH	5.48 (1H, s)	

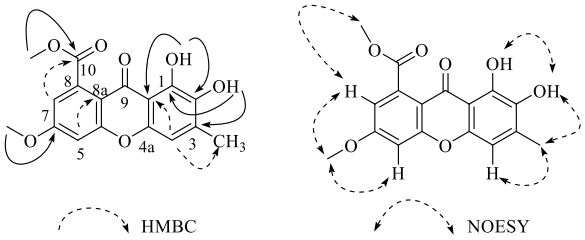

图 1 化合物 1 的结构及其关键的 HMBC 和 NOESY 相关

Fig. 1 Structure of compound 1 and key HMBC and NOESY correlations

显示了和甲基碳 (δ_C 16.8) 和 C-9a (δ_C 106.8) 的远程相关，可将该质子归属为 4 位芳香质子。在 NOESY 谱中（图 1），2 位羟基质子分别显示了和 1-OH 及 3 位甲基的 NOE 相关；7 位的芳香质子 (δ_H 6.86) 显示了和 10 位甲氧基及 6 位甲氧基的 NOE 相关；3 位的甲基信号显示了和 4 位质子 (δ_H 6.73) 和 2 位羟基 (δ_H 5.48) 的 NOE 相关信号。上述 HMBC 及 NOESY 相关数据进一步证实化合物 **1** 为 isosulochrin dehydrate 的 2 位羟基取代产物，命名为 2-羟基异硫赭曲菌素脱水合物。

化合物 **2**：橘黄色粉末（氯仿）。ESI-MS *m/z*: 337 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.10 (1H, s, H-2), 7.27 (1H, s, H-4), 6.39 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-5), 6.33 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-7), 2.49 (3H, s, 3-CH_3), 4.01 (3H, s, 6-CH_3O), 3.87 (3H, s, 12-CH_3O), 12.50 (1H, s, 8-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 133.2 (C-1), 123.9 (C-2), 146.2 (C-3), 118.8 (C-4), 155.9 (C-4a), 92.8 (C-5), 166.7 (C-6), 97.2 (C-7), 163.3 (C-8), 103.7 (C-8a), 179.2 (C-9), 115.3 (C-9a), 157.1 (C-10a), 21.8 (3-CH_3), 169.7 (C-12), 55.8 (6-CH_3O), 52.0 (12-CH_3O)。以上数据与文献报道基本一致[7]，故鉴定化合物 **2** 为 yicathin A。

化合物 **3**：黄色粉末（氯仿）。ESI-MS *m/z*: 337 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.59 (1H, s, H-2), 6.68 (1H, s, H-4), 6.86 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-5), 6.88 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-7), 2.40 (3H, s, 3-CH_3), 4.01 (3H, s, 6-CH_3O), 3.93 (3H, s, 8-$COOCH_3$), 12.27 (1H, s, 1-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 161.4 (C-1), 106 (C-2), 164.6 (C-3), 101.4 (C-4), 148.5 (C-4a), 107.1 (C-5), 155.7 (C-5a), 158.0 (C-6), 111.7 (C-7), 134.9 (C-8), 112.1 (C-8a), 179.6 (C-9), 111.2 (C-9a), 169.2 (C-10), 22.5 (3-CH_3), 56.1 (6-CH_3O), 53.1 (8-$COOCH_3$)。以上数据与文献报道基本一致[6]，故鉴定化合物 **3** 为 isosulochrin dehydrate。

化合物 **4**：黄色粉末（甲醇）。ESI-MS *m/z*: 323 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, Methanol-d_4) δ: 6.77 (1H, s, H-2), 6.61 (1H, s H-4), 6.72 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-5), 6.51 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-7), 2.33 (3H, d, J = 4.8 Hz, H-11), 3.94 (3H, d, J = 4.5 Hz, H-12), 12.3 (1H, s, 8-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, Methanol-d_4) δ: 134.7 (C-1), 112.6 (C-2), 160.8 (C-3), 111.2 (C-4), 155.6 (C-4a), 107.2 (C-5), 158.0 (C-5a), 148.3 (C-6), 103.7 (C-7), 163.4 (C-8), 106.3 (C-8a), 179.6 (C-9), 110.2 (C-9a), 170.2 (C-10), 22.3 (11-CH_3), 53.0 (12-CH_3)。以上数据与文献报道基本一致[8]，故鉴定化合物 **4** 为 1,6-二羟基-3-甲基-8-甲氧羰基呫吨酮。

化合物 **5**：黄色粉末（二甲基亚砜）。ESI-MS *m/z*: 323 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 6.81 (1H, s, H-4), 6.90 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-5), 6.82 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-7), 6.07 (1H, s, H-10a), 2.35 (3H, s, H-11), 3.85 (3H, s, H-13), 12.26 (1H, s, 1-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 160.9 (C-1), 111.6 (C-2), 149.1 (C-3), 107.7 (C-4), 155.6 (C-4a), 103.6 (C-5), 135.3 (C-6), 113.2 (C-7), 164.5 (C-8), 109.4 (C-8a), 179.4 (C-9), 106.1 (C-9a), 158.0 (C-10a), 22.3 (11-CH_3), 168.7 (12-CH_3), 53.1 (13-CH_3)。以上数据与文献报道基本一致[9]，故鉴定化合物 **5** 为 yicathin C。

化合物 **6**：黄色粉末（氯仿）。ESI-MS *m/z*: 321 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.89 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 6.87 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 6.66 (1H, s, H-5), 6.58 (1H, s, H-7), 2.39 (3H, s, 6-CH_3), 4.01 (3H, s, 10-OCH_3), 3.92 (3H, s, 3-OCH_3), 12.27 (1H, s, 8-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 134.9 (C-1), 106.5 (C-1a), 101.3 (C-2), 164.6 (C-3), 112.0 (C-4), 158.0 (C-4a), 107.1 (C-5), 155.6 (C-5a), 148.5 (C-6), 111.6 (C-7), 161.3 (C-8), 111.2 (C-8a), 179.6 (C-9), 169.2 (C-10), 22.5 (6-CH_3), 53.1 (10-OCH_3), 56.1 (3-OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致[10]，故鉴定化合物 **6** 为 wentiquinone B。

化合物 **7**：黄色结晶（氯仿），mp 229.8～230.5 ℃。ESI-MS *m/z*: 307 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.10 (1H, d, J = 1.0 Hz, H-2), 7.65 (1H, d, J = 1.0 Hz, H-4), 7.39 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-5), 6.70 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-7), 3.94 (3H, s, 6-OCH_3), 2.46 (1H, s, 3-CH_3), 12.13 (1H, s, 1-OH),

12.08 (1H, s, 8-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 162.5 (C-1), 124.5 (C-2), 148.4 (C-3), 121.3 (C-4), 133.2 (C-4a), 108.3 (C-5), 134.8 (C-5a), 166.7 (C-6), 106.8 (C-7), 165.2 (C-8), 110.3 (C-8a), 190.8 (C-9), 182.1 (C-10), 22.2 (3-CH_3), 56.1 (6-OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致[11]，故鉴定化合物 **7** 为大黄素甲醚。

化合物 **8**：黄色结晶（氯仿），mp 185.4～186.1 ℃。ESI-MS *m/z*: 337 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.60 (1H, s, H-2), 6.69 (1H, s, H-4), 6.89 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-7), 3.94 (3H, s, 6-OCH_3), 4.01 (3H, s, 8-OCH_3), 2.41 (1H, s, 3-CH_3), 12.27 (1H, s, 1-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 161.4 (C-1), 111.7 (C-2), 148.6 (C-3), 107.1 (C-4), 101.4 (C-5), 164.6 (C-6), 112.1 (C-7), 169.3 (C-8), 179.7 (C-9), 158.0 (C-10), 106.6 (C-11), 155.7 (C-12), 111.3 (C-13), 135.0 (C-14), 22.5 (3-CH_3), 56.1 (6-OCH_3), 53.1 (8-OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致[5]，故鉴定化合物 **8** 为曲霉内酯 B。

化合物 **9**：黄色粉末（氯仿）。ESI-MS *m/z*: 321 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.06 (1H, s, H-2), 7.55 (1H, s, H-4), 7.44 (1H, s, H-5), 6.77 (1H, s, H-7), 4.01 (3H, s, 6-OCH_3), 3.98 (3H, s, 8-OCH_3), 2.42 (3H, s, 3-CH_3), 13.08 (1H, s, 1-OH)；^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 162.9 (C-1), 124.7 (C-2), 146.9 (C-3), 124.7 (C-4), 137.6 (C-4a), 103.9 (C-5), 162.6 (C-6), 104.6 (C-7), 165.2 (C-8), 115.1 (C-8a), 187.4 (C-9), 114.7 (C-9a), 182.9 (C-10), 137.6 (C-10a), 21.9 (3-CH_3), 56.6 (6-OCH_3), 56.0 (8-OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致[12]，故鉴定化合物 **9** 为 8-羟基-1,3-二甲氧基-6-甲基蒽醌。

化合物 **10**：黄色粉末（甲醇）。ESI-MS *m/z*: 294 [M＋Na]$^+$。^{1}H-NMR (500 MHz, Methanol-d_4) δ: 6.60 (1H, s, H-2), 6.69 (1H, s, H-4), 6.89 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2′)；^{13}C-NMR (500 MHz, Methanol-d_4) δ: 185.4 (C-1), 132.0 (C-2), 119.0 (C-3), 111.7 (C-4), 121.5 (C-5), 115.1 (C-1′), 157.6 (C-2′), 107.9 (C-3′), 132.5 (C-4′), 107.9 (C-5′), 157.6 (C-6′)。以上数据与文献报道基本一致[13]，故鉴定化合物 **10** 为藤黄绿脓菌素。

5　细胞毒活性测试

采用 CCK-8 法测定化合物 **1**～**10** 对人食管癌细胞株 OE19 和 SK-GT-4 的细胞存活率的影响。结果表明，在 10 μmol/L 浓度，化合物 **1**～**9** 对 2 种人食管癌细胞株的增殖抑制率均在 40%以下，化合物 **10** 对 OE19 的细胞活力有显著的抑制作用，抑制率为 80.0%，进一步测定了化合物 **10** 对 OE19 细胞株的半数抑制浓度（IC_{50}）为 5.8 μmol/L。

6　讨论

本实验从大头兔儿风内生真菌 *Aspergillus wentti* Y1 的发酵液中分离鉴定了 10 个化合物，其中化合物 **1** 为新化合物。肿瘤细胞毒活性测试结果显示，化合物 **10** 对 OE19 食管癌细胞增殖表现出显著的细胞毒性，其 IC_{50} 值为 5.8 μmol/L。本研究为大头兔儿风内生真菌 *Aspergillus wentti* Y1 中次生代谢产物的研究提供了新的依据。

参考文献

[1] 陈利军. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2438-2440.

[2] 曾松宁, 徐成东. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 306-308.

[3] 徐希科, 柳润辉, 单　磊, 等. 大头兔儿风脂溶性成分研究 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(1): 54-55.

[4] 徐希科. 大头兔儿风化学成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.

[5] 孙好芬. 两株热带马尾藻内生真菌次生代谢产物研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2012.

[6] Haryadi N P, Vatcharin R, Saithong S, *et al*. Caryophyllene sesquiterpenes, chromones and 10-membered macrolides from the marine-derived fungus *Pseudopestalotiopsis* sp. PSU-AMF45 [J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(38): 130530-130530.

[7] Sun R R, Miao F P, Zhang J, *et al*. Three new xanthone derivatives from an algicolous isolate of *Aspergillus wentii* [J]. *Mag Reson Chem*, 2013, 51(1): 65-68.

[8] 田永奇, 林圣楠, 周　洪, 等. 深海来源真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01 代谢产物的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(9): 1512-1516.

[9] 秦世冬, 王　义, 王　伟, 等. 红树林耐酸真菌 *Penicillium* sp. OUCMDZ-4736 次生代谢产物研究 [J]. 中国海洋药物, 2016, 35(5): 21-28.

[10] Abdissa N, Heydenreich M, Midiwo J O, *et al*. A xanthone and a phenylanthraquinone from the roots of *Bulbine frutescens*, and the revision of six seco-anthraquinones into xanthones [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 9: 67-73.

[11] 冯　旭, 李耀华, 梁臣艳, 等. 酸藤子化学成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(12): 57-59.

[12] 麻兵继, 阮　元, 刘吉开. 长柄炭角菌子实体化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 66-68.

[13] Pan S C, Weisenborn F L. Microbiological transformation of rauwolfia alkaloids [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80(17): 4749.